

PROCEDE AUTOMATISE DE CRIBLAGE A GRANDE ECHELLE DE CELLULES SECRETANT DES ANTICORPS MONOCLONAUX

5 La présente invention se rapporte au domaine de l'identification et la sélection d'anticorps monoclonaux, présentant des propriétés avantageuses, notamment en termes de spécificité et d'affinité. L'invention concerne plus précisément l'amélioration des procédures et l'élaboration de moyens efficaces aux fins du criblage de tels anticorps.

10 La présente invention a pour objet un procédé automatisé de criblage *in vitro* et à grande échelle de cellules sécrétant au moins un anticorps monoclonal spécifique et affin pour un composé d'intérêt, ledit anticorps étant particulièrement utile à des fins de recherche, diagnostic et/ou thérapie.

15 La présente demande décrit également un procédé pour améliorer la production, par un animal, de cellules productrices d'anticorps dirigés contre un composé d'intérêt, et ce, en stimulant la réponse immunitaire de l'animal et en augmentant le nombre d'anticorps différents produits par lesdites cellules et dirigés contre le composé d'intérêt.

20 Les anticorps appartiennent à la famille des immunoglobulines. Ils sont produits par les lymphocytes B (ou cellules B ou encore « cellules productrices d'anticorps »).

 Les anticorps représentent un moyen actif essentiel pour la défense d'un organisme hôte contre un composé étranger. Une tel composé peut
25 être, par exemple, un parasite, un virus, une bactérie, un polypeptide, un polysaccharide, etc...

 Conformément à l'usage, le composé étranger susvisé est un « antigène » capable de déclencher une réponse immunitaire chez l'organisme hôte. Plus précisément, chaque antigène comprend un ou

plusieurs « épitopes », formés par la ou les parties spécifiques de ce dernier, qui réagissent avec le ou les anticorps.

L'antigène et l'anticorps se lient selon une réaction de type « ligand-récepteur ». Plus particulièrement, l'anticorps présente à sa surface un
5 site appelé « paratope », capable de reconnaître l'antigène et correspondant au site de liaison spécifique avec un épitope de cet antigène.

En réponse à la présence d'un antigène, le système immunitaire de l'organisme réagit en produisant autant de types d'anticorps différents qu'il
10 y a d'épitopes dans l'antigène.

Les cellules dendritiques sont également appelées « cellules sentinelles » ou « cellules présentatrices d'antigènes ». Ces cellules permettent la stimulation du système immunitaire humoral et cellulaire,

Le processus consistant à capter les antigènes infectieux ou
15 tumoraux, la dégradation de ces derniers dans les cellules dendritiques et la présentation des épitopes par ces cellules sont connus (Dendritic cells : biology and clinical applications. Ed. M.T. Lotze, A.W. Thomson, Academic Press, 1999). Brièvement, les agents infectieux ou tumoraux sont reconnus et dégradés à l'intérieur des cellules dendritiques. Ensuite,
20 les fragments ainsi obtenus sont présentés à la surface des cellules. Ces fragments étrangers sont alors reconnus par les lymphocytes. Le processus immunitaire humoral et cellulaire ainsi sollicité conduit à la production d'anticorps dirigés contre ces tumeurs et/ou ces agents infectieux.

25 Le recrutement des cellules dendritiques et le processus de présentation des épitopes sont des étapes essentielles dans la réponse immunitaire.

La réponse immunitaire induite par la présence d'un antigène comprend la production simultanée, par une population polyclonale de
30 lymphocytes B (i.e., une population hétérogène composée de plusieurs types de lymphocytes B), d'une multitude d'anticorps. A ce titre, cette

réponse immunitaire est polyclonale, en ce qu'elle résulte de la production de plusieurs types d'anticorps, chaque type d'anticorps étant produit par un type de lymphocyte B.

Or, l'utilisation d'anticorps polyclonaux, à des fins de recherche ou
5 diagnostic, et surtout dans le cadre de traitements prophylactiques et/ou thérapeutiques, pose à l'évidence des problèmes de spécificité vis-à-vis d'un antigène particulier.

Ces problèmes ont été jusqu'à présent en grande partie résolus grâce aux travaux de Köhler et Milstein, publiés en 1975 (Nature 256 :
10 495-497). Ces derniers ont en effet mis au point une technique de production d'anticorps monoclonaux, c'est-à-dire d'anticorps homogènes et de spécificité définie. Grâce à cette méthode et aux technologies de biologie moléculaire devenues aujourd'hui conventionnelles, la préparation d'anticorps monoclonaux à la carte, en quantités illimitées, présente un
15 intérêt considérable pour la médecine clinique, l'industrie et la recherche scientifique.

A l'heure actuelle, il est théoriquement possible de concevoir des anticorps monoclonaux contre tout type de substances, ce qui, auparavant, était difficilement envisageable. D'une manière générale, les
20 anticorps monoclonaux, de par leur spécificité et leur affinité vis-à-vis d'antigènes particuliers, constituent des outils d'identification ayant des champs d'applications très vastes : études analytiques, cytologiques, histologiques, fonctionnelles, ou biochimiques. Les anticorps monoclonaux sont ainsi très largement employés en diagnostic et dans la recherche
25 médico-pharmaceutique. Ils trouvent en outre de nouveaux débouchés en thérapie.

Les sociétés et laboratoires de biotechnologies ont, jusqu'à ce jour, adopté différentes approches et techniques afin d'identifier le « meilleur » anticorps monoclonal, i.e., l'anticorps monoclonal le plus spécifique et le
30 plus affin vis-à-vis d'un antigène impliqué dans l'étiologie d'une maladie donnée. Le meilleur anticorps ainsi identifié pourrait donc être

avantageusement utilisé dans le cadre du diagnostic, de la prévention et/ou du traitement de cette maladie. Cependant, les chercheurs et ingénieurs ne créent pas un anticorps comme l'on pourrait synthétiser une molécule chimique. En fait, leurs travaux consistent essentiellement à
5 déterminer, parmi les 10^{11} types d'anticorps produits par le système immunitaire de l'homme ou de l'animal, quels sont les anticorps qui correspondent le mieux aux antigènes en cause. La stratégie repose donc sur l'identification et la sélection du ou des meilleurs anticorps monoclonaux parmi un groupe de candidats potentiels. C'est ce que l'on
10 appelle couramment le « criblage » (ou « screening »).

Les sociétés de génomique spécialisées dans le développement d'anticorps monoclonaux disposent de banques d'anticorps potentiellement candidats pour combattre un grand nombre de maladies. Afin de réduire le nombre de candidats potentiels, tous les anticorps de la
15 banque sont mis en contact avec un antigène. Ensuite, sont sélectionnés les anticorps qui présentent le plus d'affinité vis-à-vis de cet antigène. Cependant, les banques sont constituées, non pas d'anticorps complets, mais de fragments d'anticorps (technologie dite de « phage display »). Ainsi, le plus souvent, ces sociétés parviennent à identifier rapidement des
20 fragments d'anticorps intéressants. Elles rencontrent en revanche de grandes difficultés lorsqu'il s'agit d'obtenir un anticorps complet. En effet, les banques de fragments d'anticorps ne sont généralement pas représentatives de l'ensemble des 10^{11} types d'anticorps distincts que le système immunitaire d'un organisme est capable de produire. Aussi est-il
25 nécessaire de reconstituer, par des techniques d'ingénierie, des anticorps complets à partir des fragments d'anticorps sélectionnés, ce qui peut aboutir à la construction d'anticorps de spécificité et/ou d'affinité insuffisante(s).

Les sociétés de biotechnologie cellulaire ont adopté une approche
30 différente. Des antigènes, individualisés ou non, sont injectés à des animaux (souris ou rats transgéniques humanisés). Ensuite, par

hybridation somatique classique, mais en utilisant des souris ou des rats transgéniques humanisés, un complexe cellulaire est mis en évidence, ledit complexe comprenant, entre autres, les anticorps qui ont été produits par la souris ou le rat en présence des antigènes injectés. Toutefois, ces sociétés ne disposent pas des capacités et moyens nécessaires à la mise en œuvre d'un criblage rapide et peu onéreux, permettant d'identifier chaque anticorps intéressant produit par le système immunitaire. En effet, dans la mesure où cette approche ne fait pas intervenir de techniques susceptibles d'être mises en œuvre à grande échelle, elle se trouve nécessairement limitée en ce que tous les anticorps potentiellement intéressants ne peuvent pas être identifiés par un seul criblage. En conséquence, il est probable que les candidats ainsi identifiés ne soient finalement pas les meilleurs en termes de spécificité et/ou d'affinité.

En outre, il est actuellement impossible, selon l'une ou l'autre de ces approches, d'étudier en détail les épitopes auxquels les anticorps sélectionnés se lient, sans que ces épitopes ne soient au préalable identifiés.

En définitive, il est actuellement de première nécessité de disposer de procédures et moyens permettant : d'une part, l'identification des anticorps les meilleurs en termes de spécificité et/ou d'affinité, et d'autre part l'identification des épitopes reconnus par ces anticorps.

Le procédé objet de la présente invention, dont la plupart des étapes et, en tous les cas, dont l'ensemble des étapes essentielles, est automatisable, répond à de tels soucis d'acuité du criblage (sélectionner le(s) meilleur(s) anticorps pour une application donnée et, le cas échéant, identifier les épitopes en cause), de rationalisation et d'économie, en ce qu'il : (i) permet l'identification et la sélection du ou des meilleurs anticorps parmi un grand nombre de candidats potentiels ; (ii) permet de procéder à des cartographies d'épitopes (« epitope mapping ») ; (iii) est rapide à mettre en œuvre ; (iv) fournit des résultats reproductibles ; (v) permet de cribler simultanément un grand nombre de cellules productrices

d'anticorps ; (vi) peut être mis en œuvre par un personnel non spécialisé ;
et (vii) peut être mis en œuvre à des fins de criblage en routine pour
répondre aux besoins du laboratoire de recherche ou d'analyse, de la
structure hospitalière ou de l'industrie.

5 Pour cela, le procédé selon l'invention combine avantageusement
un criblage cellulaire à grande échelle et une technologie de protéomique
permettant d'identifier précisément l'antigène et/ou le ou les épitopes
reconnus par un anticorps donné.

Grâce à cette connaissance, l'invention rend désormais possible un
10 criblage optimal des anticorps par l'identification du ou des meilleurs
anticorps pour une application donnée. Ainsi, la pertinence statistique du
criblage est améliorée, dans la mesure où le procédé objet de la présente
invention augmente non seulement la quantité d'anticorps monoclonaux
différents sécrétés par les cellules soumises au criblage, mais également
15 la qualité de ces anticorps, en termes de spécificité et/ou d'affinité.

La présente invention a donc pour objet un procédé automatisé de
criblage *in vitro* et à grande échelle de cellules sécrétant au moins un
anticorps monoclonal spécifique et affin pour un composé d'intérêt.

Par « automatisé », l'on doit comprendre que toutes les étapes
20 essentielles du procédé conforme à l'invention peuvent être, et de
préférence sont, avantageusement automatisées. En outre, sauf mention
contraire dans la suite du texte, les étapes des modes de réalisation
particuliers du procédé selon l'invention peuvent être, et de préférence
sont, également automatisées.

25 Selon un premier mode de réalisation illustré par la Figure 1, ce
procédé comprend au moins les étapes suivantes :

- (10) la distribution de cellules productrices d'anticorps dans au moins
un puits d'au moins une plaque de culture ;
- (12) la culture desdites cellules (« culture sur plaques ») dans des
30 conditions permettant leur croissance, avec détection concomitante de
la croissance cellulaire et de la qualité des cultures ;

(14) le criblage itératif desdites cellules pour la sécrétion d'anticorps, avec clonage des cellules sécrétant au moins un anticorps interagissant avec ledit composé d'intérêt ; et

5 (16) la sélection d'au moins une cellule sécrétant un anticorps monoclonal spécifique et affin pour ledit composé d'intérêt.

Au sens de l'invention, un « composé d'intérêt » est un antigène comprenant au moins un épitope. Un tel composé est notamment choisi parmi : des protéines, des acides nucléiques, des particules virales, des peptides synthétiques, des composés chimiques, des organes, des
10 organelles (par exemple, appareils de Golgi, mitochondries, etc...), des cellules entières (par exemple, cellules de mammifères, cellules végétales, bactéries, etc...), des fragmentations sub-cellulaires (par exemple, fragments de membranes cellulaires, de mitochondries, etc...) En particulier, le composé susmentionné est une cellule tumorale. En
15 pareil cas, l'on mettra avantageusement en œuvre le procédé conforme à la présente invention sur la cellule tumorale d'intérêt et, en parallèle, sur une cellule normale issue du même tissu (cellule normale correspondant à la cellule tumorale).

Les « plaques de culture », « plaques de criblage » (utilisées lors
20 de l'étape (14) de criblage itératif indiquée ci-dessus), et « plaques de stockage » pour la constitution de banques cellulaires, sont telles que classiquement utilisées pour les cultures cellulaires. En particulier, une telle plaque comprend 6, 12, 24, 96 ou 384 puits. De manière préférée, elle comprend 96 ou 384 puits.

25 Les plaques de culture obtenues lors de l'étape (10) susmentionnée représentent, dans le contexte de l'invention, les « plaques-mères » de culture.

De préférence, la distribution des cellules selon l'étape (10) est effectuée à raison d'au moins 3×10^5 cellules par puits.

30 La « culture sur plaques » des cellules conformément à l'étape (12) est effectuée en milieu sélectif classique (par exemple : milieu RPMI, 1%

mélange pénicilline/streptomycine, 1% pyruvate, 2% glutamine, 10% sérum veau foetal, 1% 8-azasérine, 1% hypoxanthine), généralement sur une période comprise entre au moins 7 jours et au plus 21 jours, ladite période étant de préférence comprise entre 7 et 15 jours. En pratique, cette période dépend de la densité des cellules dans les puits. Une fois la période de culture écoulée, le milieu de culture est changé de manière automatisée. Ainsi, le milieu ancien est prélevé et utilisé dans le cadre du criblage itératif [étape (14)], tandis que du milieu de culture neuf est ajouté aux puits des plaques-mères.

La « détection de la croissance cellulaire » concomitamment à la culture [étape (12)] peut être effectuée de manière manuelle, par un opérateur. En ce cas, l'on peut faire appel à un test statistique. Les estimateurs suivants peuvent être utilisés.

- L'estimateur c : « le puits est contaminé », avec $p(c)$ distribuée suivant une loi binomiale $B(n,p)$, où n est le nombre de puits observé par un opérateur qualifié, et p , la probabilité qu'un puits soit contaminé ; c prend la valeur discrète 1 si le puits est contaminé, ou 0 si rien d'anormal n'est observé. D'après le théorème du maximum de vraisemblance, le test est fiable à 95% si $n=30$. L'opérateur observe donc 30 puits différents choisis aléatoirement comme suit. Les puits sont numérotés de 1 à N , avec 1, le numéro du premier puits de la première plaque de 96 puits de culture (coordonnées sur la plaque : A1), et N , le numéro du dernier puits de la dernière plaque de 96 puits de culture (coordonnées sur la plaque : H12). Les numéros des puits à observer sont choisis aléatoirement dans la liste grâce à un générateur de nombres aléatoires (MS Excel).

- L'estimateur C : « au moins un puits observé est contaminé », avec $p(C)$ distribuée suivant une loi binomiale $B(1,P)$, où P , la probabilité que 30 puits soient contaminés, prend la valeur discrète 1 si au moins un puits est contaminé, ou 0 si rien d'anormal n'est observé. Si $P(C) = 0$, on considère que l'ensemble des puits de culture est exempt de

contaminations avec une fiabilité de 95%. La croissance cellulaire moyenne est évaluée empiriquement par l'opérateur sur les 30 puits observés.

Alternativement et de préférence, cette détection est automatisée,
5 par exemple au moyen d'au moins une technique choisie parmi :

- l'analyse colorimétrique du pH du milieu de culture ;
- la mesure du pH du milieu de culture à l'aide d'au moins une sonde ;
- l'analyse de l'image des puits des plaques ;
- 10 - la mesure de la conductivité du milieu de culture au moyen d'une microélectrode ;
- la turbidimétrie ; ou
- n'importe quelle combinaison de ces techniques.

Ce sont là des techniques conventionnelles, connues de l'homme
15 du métier.

Au sens de l'invention, la « qualité des cultures » fait référence à l'absence de contamination desdites cultures.

Selon un deuxième mode de réalisation illustré par la Figure 2, l'étape (14) de criblage itératif comprend au moins le module de criblage
20 suivant :

- le transfert du milieu de culture prélevé à partir d'au moins un puits d'au moins une plaque de culture ($\#n$), dans au moins un puits d'au moins une plaque de criblage ($\#n$) ;
- le criblage des cellules pour au moins un critère de sélection donné ;
- 25 - le repiquage sélectif des cellules satisfaisant ledit critère dans au moins un puits d'au moins une nouvelle plaque de culture ($\#n+1$) ; et
- la culture desdites cellules (« culture sur plaques ») dans des conditions permettant leur croissance, avec détection concomitante de la croissance cellulaire et de la qualité des cultures.

L'on entend ici par « module », un enchaînement d'étapes susceptible d'être itéré plusieurs fois, en boucle. Ainsi, d'un module au module suivant, vont changer :

- les plaques de culture initiales (#n), à partir desquelles le milieu de culture (également appelé ici « surnageant de culture ») est prélevé et transféré ;
- les plaques de criblage (#n) ;
- le ou les critères de sélection ; et
- les plaques de culture (#n+1).

10 Au sens de la présente invention, le critère de sélection est choisi parmi les critères suivants (voir Figure 2) : la sécrétion d'anticorps (« précriblage ») ; la sécrétion d'anticorps interagissant avec le composé d'intérêt (« criblage primaire ») ; la sécrétion d'anticorps monoclonaux spécifiques dudit composé d'intérêt (« criblage secondaire ») et la
15 sécrétion d'anticorps monoclonaux spécifiques et affins pour ledit composé d'intérêt (« criblage tertiaire »). De préférence, tous ces critères sont successivement appliqués dans l'ordre indiqué ci-dessus. Dans ces conditions, le module susmentionné est itéré quatre fois. Il est néanmoins possible de s'affranchir du critère de précriblage. L'on réalise alors
20 d'emblée le criblage primaire, ce qui réduit le nombre d'itérations du module supra à trois.

Avantageusement, lorsque le criblage primaire est effectué, qu'il soit précédé ou non du précriblage, l'on réalise une étape supplémentaire de clonage des cellules, comme détaillé ci-dessous [étape (146) ; voir
25 également Figure 2].

En outre, le dernier module effectué, correspondant selon l'invention au criblage tertiaire, ne comprend pas nécessairement les étapes de repiquage sélectif et culture sur plaques. En effet, le criblage tertiaire proprement dit est de préférence suivi par au moins une étape de
30 sélection d'au moins une cellule sécrétant un anticorps monoclonal dont la spécificité et/ou l'affinité pour le composé d'intérêt sont supérieures à

celles des anticorps monoclonaux sécrétés par les autres cellules [étape (16), voir Figures 1 et 2].

L'expression « repiquage sélectif des cellules » obéit à l'acception usuelle dans le domaine de la biologie cellulaire.

5 En principe, dans le cadre du criblage itératif [étape (14)], les cultures sur plaques sont réalisées en milieu standard (par exemple : milieu RPMI, 1% mélange pénicilline/streptomycine, 1% pyruvate, 2% glutamine, 10% sérum veau fœtal). Les temps de culture pour l'étape (14) sont identiques aux périodes indiquées supra s'agissant de l'étape (12).

10 La « détection de la croissance cellulaire » est telle que définie précédemment en ce qui concerne l'étape (12).

En premier lieu, le module facultatif de précriblage comprend au moins les étapes suivantes :

15 (140) le transfert du milieu de culture prélevé à partir d'au moins une plaque-mère de culture [à l'issue de l'étape (12)], sur au moins une plaque de criblage (plaque de criblage #0) ;

(141) le précriblage des cellules pour la sécrétion d'anticorps ;

(142) le repiquage sélectif des cellules sur au moins une plaque de culture (plaque de culture #1) ; et

20 (143) la culture sur plaques desdites cellules.

L'étape (141) correspond à un criblage qualitatif, comprenant au moins :

(1411) la détection de la sécrétion d'anticorps ; et

(1412) la sélection des cellules sécrétant au moins un anticorps.

25 Plus précisément, l'étape (1411) de détection de la sécrétion d'anticorps comprend au moins :

(14111) le prélèvement d'au moins un échantillon de surnageant de culture ; et

(14112) la détection de la sécrétion d'anticorps dans cet échantillon.

30 Alternativement, cette étape (1411) comprend au moins la détection de la sécrétion d'anticorps directement dans les puits.

Le précriblage selon l'étape (141), en particulier l'étape (1411) ci-dessus, est susceptible d'être mis en œuvre à l'aide de n'importe quel système de détection d'une liaison de type « ligand-récepteur », connu de l'homme du métier. A titre d'exemples, l'on peut citer des systèmes d'immunodétection qui utilisent des isotopes ou des enzymes, des techniques basées sur la détection d'une luminescence ou d'une fluorescence, des méthodes mettant en œuvre des micro-puces, etc... En particulier, l'homme du métier dispose des techniques classiques E.L.I.S.A. (pour « Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay »), des systèmes « TopCount » ou « Alpha Screen » (Perkin Elmer Life Sciences Inc., Boston, MA, Etats-Unis), ou encore FMAT 8100 ou FMAT 8200 (Applied Biosystems, Manchester, Grande-Bretagne). La mise en œuvre du précriblage peut notamment faire appel à des moyens classiques relevant de la micro- ou la nanotechnologie. Les volumes d'échantillons nécessaires sont alors avantageusement inférieurs à 10 μ L.

En second lieu, le module de criblage primaire comprend au moins les étapes suivantes :

- (144) le transfert du milieu de culture, prélevé à partir d'au moins une plaque de culture #1 si le précriblage a été réalisé, ou à partir d'au moins une plaque-mère de culture dans le cas contraire, sur au moins une plaque de criblage (plaque de criblage #1) ;
- (145) le criblage primaire des cellules pour la sécrétion d'au moins un anticorps interagissant avec le composé d'intérêt ;
- (146) le clonage des cellules sécrétant au moins un anticorps interagissant avec ledit composé d'intérêt ;
- (147) le repiquage des cellules clonées sur au moins une plaque de culture (plaque de culture #2) ; et
- (148) la culture sur plaques desdites cellules.

La détection d'une interaction dans chacun des puits d'une plaque de criblage, conformément à l'étape (145) de criblage primaire, est qualitative. Cette étape (145) comprend au moins :

(1451) le prélèvement d'au moins un échantillon de surnageant de culture ;

(1452) la détection, dans cet échantillon, de l'interaction des anticorps avec le composé d'intérêt ; et

5 (1453) la sélection des cellules sécrétant au moins un anticorps interagissant avec ledit composé d'intérêt.

Le criblage primaire visé à l'étape (145) peut être réalisé à l'aide des mêmes techniques que celles citées pour le précriblage. Là encore, le criblage primaire peut faire appel à des moyens relevant de la micro- ou
10 nanotechnologie. Ainsi, les volumes d'échantillons sont avantageusement inférieurs à 10 μ L.

Le clonage objet de l'étape (146) a pour but de passer des populations cellulaires polyclonales présentes dans les puits des plaques de précriblage et/ou criblage primaire, à des populations cellulaires
15 monoclonales. Un tel clonage peut être effectué par des méthodes conventionnelles, bien connues de l'homme du métier. Par exemple, l'on peut citer le tri cellulaire à l'aide d'un cytomètre de flux, la dilution limite, réalisée sur plaque de culture (généralement, 96 puits) en milieu standard, et le clonage en milieu gélosé. A l'issue de l'étape (146), l'on dispose
20 donc, dans chaque puits, de cellules sécrétant un anticorps monoclonal et monospécifique.

En troisième lieu, le module de criblage secondaire comprend au moins les étapes suivantes :

25 (149) le transfert du milieu de culture prélevé à partir d'au moins une plaque de culture #2, sur au moins une plaque de criblage (plaque de criblage #2) ;

(150) le criblage secondaire des cellules pour la sécrétion d'un anticorps monoclonal spécifique du composé d'intérêt ;

30 (151) le repiquage sélectif des cellules sur au moins une plaque de culture (plaque de culture #3) ; et

(152) la culture sur plaques desdites cellules.

L'étape (150) de criblage secondaire correspond à nouveau à un criblage qualitatif. A cet effet, cette étape (150) comprend au moins :

- (1501) le prélèvement d'au moins un échantillon de surnageant de culture ;
- 5 (1502) la détection, dans cet échantillon, d'une interaction spécifique entre un anticorps monoclonal et le composé d'intérêt ; et
- (1503) la sélection des cellules sécrétant un anticorps monoclonal spécifique dudit composé d'intérêt.

10 Ce criblage secondaire est réalisable à l'aide des techniques indiquées ci-dessus pour le précriblage et le criblage primaire. De manière particulièrement intéressante, les volumes d'échantillons nécessaires sont inférieurs à 10 μ L.

La notion de « spécificité » doit ici être entendue par rapport à un épitope particulier du composé d'intérêt. Deux cas de figure peuvent être
15 envisagés.

- (i) Le composé d'intérêt est une cellule tumorale. L'on effectue alors un criblage secondaire différentiel, c'est-à-dire que l'on compare les résultats issus de la détection qualitative de la liaison « anticorps monoclonal – cellule normale du même
20 tissu » par rapport à la liaison « anticorps monoclonal – cellule tumorale ». L'on considère en ce cas que la liaison « anticorps monoclonal – cellule tumorale » remplit le critère de spécificité si elle est détectée, alors qu'une liaison « anticorps monoclonal – cellule normale du même tissu » significativement plus faible, voire nulle, est détectée.
25
- (ii) Le composé d'intérêt est différent d'une cellule tumorale. Il convient alors de procéder à une cartographie du ou des épitopes, puis de déterminer qualitativement si l'anticorps monoclonal se fixe sur un épitope particulier. L'on parle de
30 « liaison spécifique » entre l'anticorps et cet épitope dès lors que cette dernière condition est remplie.

Si le composé d'intérêt est une cellule tumorale, l'homme du métier pourra, pour un meilleur résultat, combiner le criblage secondaire différentiel [cas (i)] à une cartographie d'épitopes [cas (ii)].

En quatrième lieu, le module de criblage tertiaire, qui est ici le
5 dernier module, comprend au moins les étapes suivantes :

(153) le transfert du milieu de culture prélevé à partir d'au moins une plaque de culture #3, sur au moins une plaque de criblage (plaque de criblage #3) ; et

(154) le criblage tertiaire des cellules pour la sécrétion d'un anticorps
10 monoclonal spécifique et affin pour ledit composé d'intérêt.

Facultativement, ce module comprend en outre :

(155) le repiquage sélectif des cellules sur au moins une plaque de culture (plaque de culture #4) ; et

(156) la culture sur plaques desdites cellules.

15 Le criblage tertiaire objet de l'étape (154) permet de comparer, de manière quantitative, l'affinité et la spécificité des anticorps monoclonaux, et, le cas échéant, d'établir une cartographie des épitopes portés par le composé d'intérêt. Ainsi, l'étape (154) comprend au moins :

(1541) le prélèvement d'au moins un échantillon de surnageant de
20 culture ; et

(1542) la mesure de l'affinité d'un anticorps monoclonal pour le composé d'intérêt.

Plus précisément, l'étape (1542) ci-dessus comprend au moins :

(15421) la mesure de l'affinité d'un anticorps monoclonal pour le
25 composé d'intérêt ; et

(15422) l'identification et/ou la localisation d'au moins un épitope dudit composé d'intérêt.

L'identification et/ou la localisation d'épitopes (« epitop mapping ») sont également désignées ici par l'expression « cartographie d'épitopes ».

30 De manière intéressante, les étapes (15421) et (15422) susmentionnées peuvent être concomitantes.

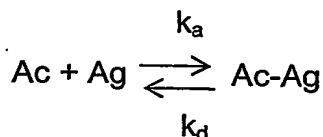
Avantageusement, l'étape (154) de criblage tertiaire comprend en outre :

(1543) le classement des anticorps monoclonaux sur la base de leur spécificité et/ou de leur affinité pour le composé d'intérêt.

5 Le complexe antigène-anticorps est obtenu par complémentarité spatiale et via l'établissement de liaisons de faible énergie (telles des liaisons hydrogène, électrostatiques, de Van der Waals, hydrophobes) entre les deux paratopes et l'épitope. La somme de ces interactions représente une interaction globale plus ou moins forte en fonction de la
10 spécificité de l'anticorps pour l'épitope. De fait, l'association antigène-anticorps est réversible, avec une énergie d'interaction qui varie d'un couple épitope-paratope à l'autre.

Dans un modèle de cinétique 1:1, ou modèle monovalent, les énergies d'interaction de chacun des deux paratopes ne sont pas prises
15 en considération. L'énergie globale d'interaction (à savoir l'énergie de dissociation du complexe) est supérieure à la somme arithmétique des énergies d'interaction des deux paratopes. Cette énergie globale est caractérisée par une constante d'équilibre, dite « constante d'affinité » ou « constante d'association » K_D , exprimée en L/mol ou M^{-1} , et par deux
20 constantes cinétiques d'association et de dissociation, respectivement k_a et k_d (exprimées en M^{-1} ou min^{-1}). Physiquement, K_D représente l'inverse de la concentration d'anticorps minimale nécessaire pour que la réaction de formation du complexe soit à l'équilibre pour un antigène donné. La constante d'affinité K_D est donnée par la formule suivante :

25



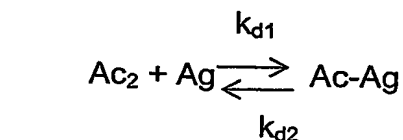
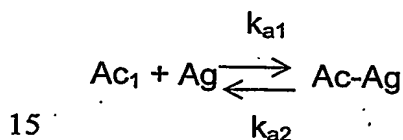
30 $K_D = k_d/k_a = [Ac-Ag]/([Ac].[Ag])$

où: [Ac] = concentration en anticorps

[Ag] = concentration en antigène

[Ac-Ag] = concentration en complexe antigène-anticorps.

- 5 Dans le modèle de cinétique 2:1, ou modèle bivalent, plus proche de la réalité, l'on considère les constantes cinétiques d'association et de dissociation de chaque paratope : k_{a1} , k_{d1} pour un site, et k_{a2} et k_{d2} pour l'autre site. Le calcul d'une constante K_D globale est alors impossible. Un tel modèle tient compte du fait que l'interaction avec un site conditionne
10 l'interaction avec l'autre site, en fonction de l'accessibilité de l'épitope. Les réactions suivantes sont alors mises en jeu :



où: Ac_1 : premier site d'interaction de l'anticorps (ou paratope n°1)

Ac_2 : second site d'interaction de l'anticorps (ou paratope n°2).

- 25 Les constantes k_{a1} , k_{d1} , k_{a2} , k_{d2} peuvent être mesurées graphiquement par linéarisation de courbes standard.

- En pratique, le criblage tertiaire peut notamment être réalisé au moyen d'un dispositif de type Biacore 3000 ou Biacore S51 (Biacore AB, Paris, France). Ces dispositifs permettent la mesure de la cinétique d'interaction d'un anticorps avec un antigène, les constantes associées
30 pour chacun des modèles décrits ci-avant, ainsi que le R_{50} , à savoir le signal obtenu pour 50% d'anticorps liés. Pour ce faire, ils utilisent la

mesure de la variation d'énergie du nuage d'électrons libres d'un métal (ou plasmon) lorsqu'il est excité par un faisceau de lumière polarisée. Selon un mode d'expérimentation, les anticorps sont fixés sur une plaque de métal soumis à un rayonnement laser. Une solution d'antigène est
5 alors injectée et « passe » sur les anticorps fixés avec un débit connu, pendant une durée déterminée. L'appareil mesure ensuite les variations d'énergie plasmonique en fonction de la fixation de l'antigène. Le calcul des constantes est effectué automatiquement à l'aide des résultats expérimentaux ainsi obtenus.

10 Alternativement, la mesure de l'affinité de liaison [étape (15421) mentionnée ci-dessus], représentée par les constantes K_D , R_{50} , k_a , k_d dans le cas du modèle de cinétique 1:1, ou bien R_{50} , k_{a1} , k_{d1} , k_{a2} , k_{d2} dans le cas du modèle de cinétique 2:1, ainsi que la cartographie des épitopes [étape (15422) sus-citée] sont réalisées au moyen d'au moins une technique
15 d'analyse cinétique d'interaction ligand-récepteur telle que :

- un test RIA ;
- un test ELISA ;
- les techniques de protéomique conventionnelles, connues de l'homme du métier ; et
- 20 - l'utilisation de micro-puces.

De manière plus particulière, aux fins de cartographier des épitopes, l'on utilise une plateforme protéomique classique. Une telle plateforme est généralement composée d'un système d'électrophorèse à 2 dimensions, ou système électrophorèse 2D, permettant de faire migrer
25 des protéines, ou des fragments protéiques, en fonction de deux paramètres : leur poids moléculaire et leur charge. Par exemple, pour analyser le profil électrophorétique d'une cellule tumorale par rapport à une cellule normale du même tissu, des échantillons de ces cellules sont préparés afin de séparer la fraction protéique. Puis, les échantillons sont
30 placés sur un gel et migrent sous l'effet d'un champ électrique. Lors de la révélation, l'on peut comparer, soit à l'œil, soit à l'aide d'un scanner et

d'un logiciel d'analyse d'images, les profils électrophorétiques des deux cellules, et identifier les signaux ou « spots » spécifiques de la cellule tumorale, ou encore les protéines surexprimées ou sous-exprimées par la cellule tumorale par rapport à la cellule normale. Les spots spécifiques
5 des cellules tumorales sont alors prélevés manuellement (découpage du gel), ou grâce à un robot de prélèvement dont le fonctionnement est couplé à l'analyse informatique d'images. Les protéines emprisonnées dans les fragments de gel sont remises en solution. Leur séquence est déterminée grâce à un spectromètre de masse de type MALDI-TOFF. Il
10 est alors possible d'effectuer une nouvelle électrophorèse 2D des fragments peptidiques identifiés à partir des résultats ainsi obtenus sur les protéines, et de cartographier les épitopes de la protéine entière en ajoutant sur le gel les anticorps criblés. Si le composé d'intérêt est une protéine, seule cette seconde électrophorèse 2D est pratiquée,
15 alternativement à l'« epitop mapping » effectué grâce à un dispositif de type Biacore (voir supra). Le procédé avec ce dispositif est similaire à celui décrit ci-dessus : les anticorps « passent » sur un tapis de fragments peptidiques (un seul type de fragments par « tapis ») et interagissent avec différentes affinités avec ces derniers. Ce procédé présente l'avantage de
20 fournir, en sus de la cartographie, l'affinité de l'interaction. Cependant, il est plus fastidieux à mettre en œuvre que l'électrophorèse 2D.

Selon un troisième mode de réalisation, une banque cellulaire est constituée pour au moins un module de criblage de l'étape (14), à partir des plaques de culture obtenues après repiquage sélectif. Ainsi, une
25 banque est constituée à l'issue de :

- l'étape (142) pour le module de précriblage, si ce dernier est mis en œuvre ; et/ou
- l'étape (147) pour le module de criblage primaire ; et/ou
- l'étape (151) pour le module de criblage secondaire ; et/ou
- 30 - le cas échéant, l'étape (155) pour le module de criblage tertiaire.

De manière préférée, une banque cellulaire est constituée pour chacun des modules de criblage cités ci-dessus.

Pour ce faire, les cellules repiquées sur au moins une plaque de culture [étapes (142), (147), (151) et (155)] sont de nouveau repiquées sur
5 au moins une plaque de stockage, où elles sont encore cultivées sur une période d'environ 7 jours. Puis, les cellules sont prélevées, cultivées et congelées selon les techniques connues de l'homme du métier.

Selon un quatrième mode de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention, illustré par les Figures 1 et 2, l'étape (14) de
10 criblage itératif est suivie par au moins :

(16) la sélection d'au moins une cellule sécrétant un anticorps monoclonal de spécificité et/ou d'affinité pour le composé d'intérêt supérieures à celles des anticorps monoclonaux sécrétés par les autres cellules.

15 Cette étape (16) peut ne pas être automatisée.

Selon un cinquième mode de réalisation illustré par la Figure 3, l'étape (10) de distribution citée ci-dessus est au moins précédée par les étapes préliminaires suivantes :

- 20 (1) l'immunisation d'au moins un animal, avec le composé d'intérêt ;
(2) facultativement, la mesure de la réponse immunitaire dudit animal ;
et
(3) la récupération des cellules productrices d'anticorps.

Alternativement, au moins les étapes préliminaires suivantes précèdent l'étape (10) de distribution :

- 25 (0) la mise en contact d'au moins une cellule dendritique (ou « cellule présentatrice d'antigène ») et du composé d'intérêt, de sorte que ladite cellule dendritique présente au moins un épitope dudit composé d'intérêt ;
(1) l'immunisation d'au moins un animal, avec ladite cellule dendritique
30 présentant ledit épitope ;

(2) facultativement, la mesure de la réponse immunitaire dudit animal ;
et

(3) la récupération des cellules productrices d'anticorps.

A l'issue de l'étape (0) de mise en contact, la cellule dendritique a
5 internalisé et découpé le composé d'intérêt, de manière à présenter à sa
surface des fragments dudit composé, ces fragments comprenant, le cas
échéant, un ou plusieurs épitopes du composé en cause.

De préférence, lorsque le composé d'intérêt est une cellule
tumorale, l'étape (0) supra comprend au moins :

- 10 (01) la fusion de la cellule dendritique et de la cellule tumorale ; et
(02) la récupération d'au moins une cellule dendritique hybride.

Par « cellule dendritique hybride », l'on entend une cellule
dendritique fusionnée avec une cellule tumorale. Une telle cellule hybride
présente avantageusement à sa surface non seulement les épitopes
15 présentés normalement par la cellule tumorale, mais aussi les épitopes
cryptiques, qui ne sont normalement pas présentés par la cellule tumorale.
Une telle cellule, comme le montre l'exemple II-1 ci-dessous, a l'avantage
de posséder les caractéristiques de la cellule dendritique et de présenter
davantage d'épitopes de la cellule tumorale que cette dernière, en temps
20 normal.

Lors de l'étape (1) d'immunisation, divers adjuvants peuvent être
utilisés, notamment l'adjuvant de Freund complet ou incomplet, ou tout
autre mélange de protéines et glycolipides connu de l'homme du métier
pour son utilisation comme adjuvant d'immunité chez l'homme et/ou
25 l'animal.

Plusieurs voies d'inoculation peuvent être envisagées. En
particulier, l'on peut citer les voies sous-cutanée, intradermique,
intraveineuse, intra-péritonéale, intra-splénique, etc...

L'inoculation peut être effectuée à l'aide d'un composé d'intérêt
30 unique ou d'une combinaison de tels composés, selon des programmes

d'intervalles de temps et de quantités de composé(s) d'intérêt éventuellement variables.

Les techniques d'immunisation afin de produire des anticorps font partie des connaissances générales de l'homme du métier.

5 L'étape facultative (2) supra correspond à la mesure de la réponse immunitaire humorale de l'animal immunisé. Cette étape (2) peut avantageusement être mise en œuvre à l'aide de méthodes classiques. Par exemple, un prélèvement sanguin est effectué sur l'animal. Les immunoglobulines G circulantes spécifiques du composé d'intérêt sont
10 ensuite dosées par E.L.I.S.A.

La récupération des cellules productrices d'anticorps selon l'étape (3) consiste, par exemple, à sacrifier l'animal pour prélever sa rate. Les cellules sont ensuite dissociées de manière habituelle.

A titre d'exemples de cellules productrices d'anticorps convenant à
15 la mise en œuvre du procédé objet de la présente invention, l'on peut citer les cellules de rate de souris, de rat, de lapin, et d'homme. De préférence, les cellules productrices d'anticorps sont des cellules de souris.

Selon un mode de réalisation avantageux, les étapes préliminaires ci-dessus comprennent en outre (voir Figure 3) :

20 (4) la fusion des cellules productrices d'anticorps ainsi récupérées avec des cellules immortalisées ; et

(5) la récupération des cellules productrices d'anticorps immortalisées.

Pour ce faire, de préférence, les cellules productrices d'anticorps sont fusionnées, par l'opérateur, avec des cellules tumorales, notamment
25 des myélomes.

Selon un mode de réalisation particulier, les étapes préliminaires mentionnées ci-dessus [(1), (2), (3) et, le cas échéant, (4), (5)] ou [(0), (1), (2), (3) et, le cas échéant, (4), (5)] ne sont pas automatisées.

Selon un sixième mode de réalisation, chaque étape du procédé
30 objet de la présente invention est réalisée en atmosphère stérile. Par défaut, toutes les étapes des modules du criblage itératif [étape (14)]

peuvent être mises en œuvre en atmosphère non stérile, dès lors que l'étape initiale de chaque module, correspondant au transfert du milieu de culture sur des plaques de criblage [étapes (140), (144), (149) et (153)], est effectuée en milieu stérile. Ainsi, l'ajout des réactifs dans les puits des
5 plaques de criblage, l'incubation desdites plaques et la lecture des résultats du criblage peuvent être réalisées en atmosphère non stérile, et ce, même si le composé d'intérêt est une cellule. En tous les cas, toutes les étapes du procédé objet de l'invention qui font intervenir les cellules productrices d'anticorps sont réalisées en atmosphère stérile : notamment,
10 les étapes de culture sur plaques (12), (143), (148), (152) ; les étapes de transfert (140), (144), (149), (153) ; les étapes de repiquage sélectif (142), (147), (151), (155) ; et la constitution des banques cellulaires.

Un dispositif de mise en œuvre d'un procédé tel que décrit ci-dessus, comprend au moins un système automatique contrôlant :

- 15 - au moins une partie de commande d'au moins un robot ; et
- au moins une partie d'acquisition et traitement des données.

Au sens de l'invention, un « système automatique » est un dispositif assurant un enchaînement automatique et asservi de tâches conformément aux instructions d'un opérateur.

20 Ainsi, par son fonctionnement, ce système automatique tend à annuler l'écart entre une grandeur commandée (grandeur générée par le moyen « asservi », c'est-à-dire par le système automatique lui-même) et une grandeur de commande (ici, l'instruction générée par l'opérateur).

Selon l'acception usuelle, un « robot » est un dispositif automatique
25 capable de manipuler des objets ou d'exécuter des opérations selon un programme fixe ou paramétrable.

Un « programme » est une séquence d'instructions, lesdites « instructions » étant des ordres exprimés en langage de programmation, dont l'interprétation entraîne l'exécution d'opérations élémentaires
30 déterminées.

Un « paramètre » est une variable dont la valeur, l'adresse ou le nom n'est précisé qu'à l'exécution du programme.

Les « données » représentent ici les résultats d'observations ou d'expériences.

5 Selon des modes particuliers de réalisation, ledit système automatique est programmé et/ou paramétré par l'opérateur (instructions de l'opérateur).

Le système automatique comprend alors avantageusement une mémoire dans laquelle est enregistré au moins un programme et/ou au
10 moins un paramètre.

Le dispositif en question est tel que le système automatique génère les instructions nécessaires au déroulement des étapes et sous-étapes automatisées du procédé décrit précédemment.

Dans ce dispositif, la partie de commande d'au moins un robot
15 contrôle elle-même, conformément aux instructions générées par l'automate, ledit robot.

En particulier, un tel robot est capable de :

- saisir, déplacer, positionner en (x,y,z) au moins une plaque de culture, ou de criblage, ou encore de stockage ; et/ou
- 20 - stocker ladite plaque ; et/ou
- prélever du milieu liquide dans au moins un puits situé à une position (x,y,z) prédéterminée de ladite plaque ; et/ou
- laver ledit puits.

La partie d'acquisition et traitement des données, présente dans ce
25 dispositif, analyse, conformément aux instructions générées par le système automatique, les données fournies par au moins un moyen de détection qualitative et/ou quantitative des cellules présentes dans au moins un puits d'une plaque de culture ou criblage.

Un moyen de détection particulièrement adapté à une mise en
30 œuvre dans le dispositif en cause, est notamment choisi parmi :

- une unité photométrique d'analyse dudit puits ;

- une unité d'analyse d'image dudit puits ;
 - une unité d'autoradiographie comprenant au moins un moyen de mesure de la radioactivité dudit puits ;
 - une unité de tri cellulaire comprenant au moins un moyen de
- 5 séparation des cellules ; et
- un dispositif de type Biacore 3000 ou Biacore S51 (voir description supra).

L'ensemble de ces moyens de détection fait intervenir des techniques conventionnelles connues de l'homme du métier.

10 Dans un tel dispositif, au moins les parties qui interviennent sur les cellules productrices d'anticorps elles-mêmes se trouvent en atmosphère stérile. Ainsi, les parties du dispositif mettant en oeuvre les étapes des modules du criblage itératif [étape (14)] peuvent être situées en

15 atmosphère non stérile, dès lors que l'étape initiale de chaque module, correspondant au transfert du milieu de culture sur des plaques de criblage [étapes (140), (144), (149) et (153)], est effectuée en milieu stérile.

Par ailleurs, la présente demande divulgue un procédé pour améliorer la production, par un animal, de cellules productrices d'anticorps dirigés contre un composé d'intérêt.

20

Dans le présent contexte, ce procédé permet de stimuler la réponse immunitaire de l'animal et d'augmenter le nombre d'anticorps différents produits par les cellules et dirigés contre le composé d'intérêt.

Selon un premier mode de réalisation, le procédé ici décrit

25 comprend au moins les étapes suivantes :

- (20) la mise en contact d'au moins une cellule dendritique et du composé d'intérêt, de sorte que ladite cellule dendritique présente au moins un épitope du composé d'intérêt ;
 - (22) l'immunisation d'un animal, avec la cellule dendritique présentant
- 30 ledit épitope ;

(24) facultativement, la mesure de la réponse immunitaire dudit animal ; et

(26) la récupération des cellules productrices d'anticorps.

Le « composé d'intérêt » ici visé obéit à la définition donnée supra.

5 Lorsque le composé d'intérêt est une cellule tumorale, le procédé comprend, de préférence, au moins les étapes suivantes :

(30) la fusion d'au moins une cellule dendritique et de ladite cellule tumorale ;

(32) la récupération d'au moins une cellule dendritique hybride ;

10 (34) l'immunisation d'un animal, avec ladite cellule dendritique hybride ;

(36) facultativement, la mesure de la réponse immunitaire dudit animal ; et

(38) la récupération des cellules productrices d'anticorps.

15 Une cellule dendritique, ou cellule présentatrice d'antigène, convenant à la mise en œuvre du procédé selon l'invention, est, par exemple, une cellule dendritique de souris.

La mise en contact visée à l'étape (20) est réalisée de manière conventionnelle, par exemple dans des plaques de culture classiques.

20 La fusion selon l'étape (30) fait appel à des techniques classiques pour l'homme du métier.

Une « cellule dendritique hybride » telle que susmentionnée répond à la définition supra.

25 Les étapes (22), (24) et (26) ou (34), (36) et (38) sont telles que définies précédemment.

Selon un deuxième mode de réalisation, le procédé décrit ci-dessus comprend en outre au moins les étapes suivantes :

(40) la fusion des cellules productrices d'anticorps ainsi récupérées avec des cellules immortalisées ; et

30 (42) la récupération des cellules productrices d'anticorps immortalisées.

Ces étapes sont conformes aux définitions données supra.

En outre, la présente demande divulgue l'application du procédé décrit ci-dessus, pour améliorer la production, par un animal, de cellules productrices d'anticorps, au criblage *in vitro* et à grande échelle de cellules sécrétant au moins un anticorps monoclonal spécifique et affin pour un composé d'intérêt, conformément au procédé objet de l'invention.

La présente invention est illustrée, sans pour autant être limitée, par les figures suivantes :

Figure 1 : représentation schématique du procédé essentiellement automatisé de criblage de cellules sécrétant au moins un anticorps monoclonal – Vue globale.

Figure 2 : représentation schématique des étapes relatives au criblage itératif selon l'étape (14) de la Figure 1 – Vue détaillée.

Les flèches en pointillé indiquent les étapes facultatives.

Figure 3 : représentation schématique des étapes préliminaires concernant le procédé schématisé sur la Figure 1.

Les voies A et B sont alternatives.

Les exemples qui suivent sont destinés à illustrer, de manière non limitative, des modes de réalisation particuliers de la présente invention.

EXEMPLES

I- PROCEDE DE CRIBLAGE :

I-1- Etapes préliminaires :

Ces étapes sont illustrées par la Figure 3.

A- Etapes d'immunisation et de récupération des cellules productrices d'anticorps [étapes (1) et (3)] :

Dans le cas de l'immunisation d'une souris avec une cellule tumorale (composé d'intérêt), l'animal est sacrifié après environ 60 à 65 jours. On prélève alors la rate de l'animal. Les cellules sont ensuite dissociées selon un protocole standard, connu de l'homme du métier.

5

B- Etapes de fusion cellulaire et de récupération de cellules immortalisées [étapes (4) et (5)] :

Les cellules dissociées sont mises en présence de cellules de myélome murin. La fusion s'opère de façon aléatoire avec un rendement
10 estimé à 0,001%. Le nombre de cellules productrices d'anticorps immortalisées (ou cellules hybrides, ou encore hybridomes) ainsi générées à environ 3×10^8 cellules.

I-2- Procédé de criblage :

15

Ces étapes sont illustrées par les Figures 1 et 2.

A- Etape de répartition (10) :

Les cellules productrices d'anticorps ou les hybridomes sont répartis automatiquement par un robot faisant partie du dispositif de mise
20 en œuvre du procédé, dans des plaques de culture de 96 puits à raison de 100 000 cellules par puits environ, dans un milieu sélectif.

On dispose ainsi, par exemple, d'un lot de départ de 160 plaques-mères de culture.

25

B- Etape de culture sur plaques (12) :

Les plaques-mères de culture sont sorties automatiquement tous les jours de l'incubateur et le milieu de culture est remplacé automatiquement par du milieu neuf.

Au bout de 7 jours de culture, le milieu de culture est changé.

30

A partir de cette étape, l'on entre dans l'étape (14) de criblage itératif (voir Figure 2).

C- Module de précriblage :

a) Etape de transfert (140) :

5 Le milieu ancien ainsi prélevé est déposé dans 160 plaques de criblage (plaques de criblage #0) à raison de 100 μ l par puits en suivant précisément la même topographie des puits que celle présentée par les plaques de culture. Ces plaques de criblage sont référencées par rapport aux plaques-mères par un code barre.

10

b) Etape de précriblage (141) :

Un anticorps anti-IgG couplé à une bille est ajouté à raison de 10 μ l par puits aux puits desdites plaques de criblage #0. Un autre anticorps couplé à une molécule fluorescente est ajouté à raison de 10 μ l par puits.

15 Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, les plaques de criblage sont lues par l'appareil FMAT 8200 (Applied Biosystems) [étape (1411) réalisée, selon cet exemple, directement dans les puits]. Selon cette méthode de détection, le fluorochrome est excité par un laser. L'appareil génère une image des complexes anticorps-billes, à condition

20 qu'au moins une population d'IgG soit présente dans l'échantillon. Le signal spécifique est optimisé par rapport au bruit de fond, correspondant au signal émis par les réactifs dissociés.

A chaque puits est associé le nombre de photons émis par seconde par l'ensemble des complexes. Les puits ne contenant pas d'anticorps

25 sont caractérisés par un ratio signal/bruit de fond proche de 1 et sont éliminés. De même, les puits pour lesquels les signaux obtenus sont d'intensité inférieure à une valeur seuil fixée en fonction de l'étalonnage du test, sont également éliminés [étape (1412)].

30 *c) Etape de repiquage (142) :*

En fonction de ces résultats, le robot prélève de manière sélective les cellules dans les puits des plaques-mères de culture, dès lors qu'un signal positif significatif a été détecté dans les puits correspondants des plaques de criblage #0.

- 5 Les puits considérés sont alors réunis et partagés en deux lots identiques de 4 plaques (lots n°1 et n°2). Ces nouvelles plaques de culture (plaques de culture #1) sont référencées par rapport aux plaques-mères de culture par un code barre.

10 *d) Etape de culture sur plaques (143) :*

Les cellules sont cultivées ensuite de la même façon, pendant 7 jours suivant le protocole de changement périodique de milieu décrit ci-dessus.

15 *D- Module de criblage primaire :*

a) Etape de transfert (144) :

- 20 Au bout de 7 jours de culture, les mêmes cellules que celles qui ont été utilisées pour l'immunisation [composés d'intérêt : étape (1) supra] sont distribuées automatiquement dans 4 plaques de criblage (plaques de criblage #1) à raison de 100 000 cellules par puits, pour un volume initial de 50 μ l/puits.

Le milieu de culture du lot n°1 de plaques de culture d'hybridomes (plaques de culture #1) est changé.

- 25 50 μ l du milieu ancien prélevé sont redéposés dans les 4 plaques de criblage (plaques de criblage #1) ensemencées avec les composés d'intérêt, en suivant précisément la même topographie des puits. Ces plaques de criblage #1 sont référencées par rapport aux plaques de culture #1 par un code barre.

- 30 De manière concomitante, le lot n°2 de 4 plaques de culture #1 est amplifié par transfert du contenu de chaque puits dans 3 puits d'un

nouveau lot de 12 plaques de 96 puits, et cultivé pendant 7 jours. Parmi chaque triplet, le puits où les cellules présentent la meilleure croissance est sélectionné et les cellules sont repiquées dans un puits d'un lot de 12 plaques de 24 puits. Enfin, après 7 jours de culture, les cellules de chaque puits sont transférées dans 288 flasques de culture cellulaire. Après 7 jours de culture, les cellules sont prélevées, centrifugées et congelées dans l'azote liquide (-173°C) pour constituer une première banque cellulaire.

10 *b) Etape de criblage primaire (145) :*

10 μ l d'un anticorps anti-IgG couplé à une molécule fluorescente sont ajoutés. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, les plaques de criblage #1 sont lues par l'appareil FMAT 8200 [étape (1452)]. Le fluorochrome est excité par un laser et l'appareil génère une image des cellules marquées, à condition qu'au moins une population d'anticorps spécifique soit présente dans l'échantillon. Le signal spécifique est discriminé par rapport au bruit de fond.

A chaque puits est associé le nombre de photons émis par seconde par l'ensemble des cellules ainsi marquées. Les puits ne contenant pas d'anticorps spécifique d'un épitope présent à la surface de la cellule cible sont caractérisés par un ratio signal/bruit de fond proche de 1 et sont éliminés. De même, les puits pour lesquels les signaux obtenus sont d'intensité inférieure à une valeur seuil fixée en fonction de l'étalonnage du test, sont également éliminés [étape (1453)].

25 Les autres, soit 15 puits, sont repiqués dans trois lots de 1 plaque de culture (lots n°3, 4 et 5).

Le lot n°3 est amplifié par transfert du contenu de chaque puits dans 3 puits d'un nouveau lot de plaques de 45 puits, et cultivé pendant 7 jours. Pour chaque triplet, le puits où les cellules présentent la meilleure croissance est sélectionné, et les cellules repiquées dans un puits d'un lot de 1 plaque de 24 puits. Enfin, après 7 jours de culture, les cellules de

chaque puits sont transférées dans 15 flasques de culture cellulaire. Après 7 jours de culture, les cellules sont prélevées, centrifugées et congelées dans l'azote liquide (-173°C) pour constituer une deuxième banque.

5 c) *Etape de clonage (146) :*

Après 7 jours d'entretien des cultures, les cellules du lot n°2 sont transférées par le robot dans des tubes de clonage.

Un anticorps anti-IgG couplé à un fluorochrome [e.g., une cyanine (Amersham Biosciences)] est ajouté automatiquement dans les puits.

- 10 Celui-ci se fixe spécifiquement sur les immunoglobulines de surface des hybridomes à condition qu'au moins une population de cellules (ou clone) sécrète des anticorps.

- 15 Après 10 minutes d'incubation, les cellules sont clonées dans une plaque de culture à l'aide d'un cytomètre de flux analyseur-trieur, qui dépose sélectivement les cellules marquées par l'anticorps à raison d'une cellule par puits. On obtient ainsi, par exemple, 7 clones positifs.

- 20 Les étapes de repiquage des cellules clonées sur les plaques de culture #2 [étape (147)] et culture sur plaques [étape (148)] sont identiques à celles décrites ci-dessus.

E- Module de criblage secondaire :

a) *Etape de transfert (149) :*

- 25 Après 7 jours de culture, les mêmes cellules que celles qui ont été utilisées pour l'immunisation [composés d'intérêt : étape (1)] sont distribuées automatiquement dans 1 plaque de criblage (plaque de criblage #2) à raison de 100 000 cellules par puits, pour un volume initial de 50 µl/puits.

- 30 Un autre lot de deux plaques de criblage #2 estensemencé avec des cellules, provenant du même tissu que les cellules cibles, mais

présentant un phénotype sain. Ces cellules sont dites « normales » ou « témoins ».

Le milieu de culture du lot n°1 de plaques de culture d'hybridomes (plaques de culture #2) est changé. Le milieu ancien est conservé. 50 μ l de ce milieu sont déposés dans la plaque de criblage #2 ensemencée avec les cellules cibles. 50 autres μ l du milieu ancien sont déposés dans le lot ensemencé avec les cellules témoins en suivant précisément la même topographie des puits. Ces plaques de criblage #2 sont référencées par rapport aux plaques de culture #2 par des codes-barres.

10.

b) Etape de criblage secondaire (150) :

10 μ l d'un anticorps anti-IgG couplé à une molécule fluorescente sont ajoutés dans lesdites plaques de criblage #2.

Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, les plaques de criblage #2 sont lues par l'appareil FMAT 8200 [étape (1502)]. L'appareil génère une image des cellules marquées, à condition qu'au moins une population d'anticorps spécifique de l'un ou l'autre des types cellulaires (tumoral ou normal) soit présente dans l'échantillon. Le signal spécifique est discriminé par rapport au bruit de fond.

20 Par comparaison entre les puits contenant le même échantillon de surnageant, les anticorps dirigés spécifiquement contre les cellules cibles sont identifiés. Ceci correspond par exemple à 3 clones [étape (1503)].

Immédiatement après le prélèvement des surnageants de culture, les clones cellulaires sont amplifiés par transfert de chaque puits dans 3 puits d'un nouveau lot de plaque de 21 puits, et cultivés pendant 7 jours.

25 Pour chaque triplet, le puits où les cellules présentent la meilleure croissance est sélectionné, et les cellules sont repiquées dans un puits d'un lot de 1 plaque de 24 puits. Enfin, après 7 jours de culture, les cellules de chaque puits sont transférées dans 7 flasques de culture cellulaire. Après 3 à 7 jours de culture, les cellules sont prélevées,

30

centrifugées et congelées dans l'azote liquide (-173°C) pour constituer une troisième banque.

5 Les étapes de repiquage sélectif des cellules sur les plaques de culture #3 [étape (151)] et culture sur plaques [étape (152)] sont identiques à celles décrites ci-dessus.

F- Module de criblage tertiaire :

10

a) Etape de transfert (153) :

Les surnageants de culture des 3 clones identifiés lors du criblage secondaire sont prélevés et déposés dans 3 puits d'une plaque de criblage #3.

15

b) Etape de criblage tertiaire (154) :

L'affinité des anticorps pour l'antigène est analysée grâce à un appareil de type Biacore 3000 [étape (1542)].

20 Les anticorps sont classés en fonction des constantes d'affinité et/ou cinétiques obtenues [étape (1543)]. A ce stade, il reste, par exemple, deux anticorps.

25 Les antigènes totaux des cellules cibles sont isolés par les techniques de protéomique et immobilisés par Western blot. Les deux anticorps sélectionnés lors du criblage tertiaire sont déposés sur les protéines ainsi fixées. Après incubation, on ajoute un anticorps anti-IgG marqué avec un fluorochrome (par exemple, la fluorescéine). On identifie, par détection de la fluorescence, l'antigène spécifique de chaque anticorps [étape (15422)].

30 **II- PROCÉDE POUR AMÉLIORER LA PRODUCTION DE CELLULES PRODUCTRICES D'ANTICORPS :**

L'exemple qui suit illustre le cas où le composé d'intérêt considéré est une cellule tumorale [étapes (30) à (38)].

II-1- Matériels et méthodes [étapes (30) et (32)] :

5 Les expériences ont été réalisées chez la souris, avec des cellules dendritiques murines, et des cellules de myélome murin (SP2/O).

Les cellules dendritiques hybrides (cellules DH) obtenues par fusion [étape (30)] ont été analysées. Elles possèdent le caractère des cellules dendritiques de souris (reconnaissance par des anticorps spécifiques de ces cellules en cytofluorométrie). En outre, elles présentent à leur surface les épitopes, y compris les épitopes cryptiques, de la cellule tumorale. Cette dernière caractéristique a été vérifiée après fusion de cellules dendritiques et de cellules de myélome SP2/O et observation en microscopie électronique. La présence de particules intracisternales A (IAP) était exclusive des cellules SP2/O, ce qui a confirmé l'hybridation.

II-2- Etape (34) d'immunisation et étapes suivantes :

Le protocole d'immunisation a été le suivant. Quatre groupes de quatre souris Balb/c ont été traités comme suit :

- 20 - groupe A : 4 souris ont été immunisées avec des cellules SP2/O ;
- groupe B : 4 souris ont été immunisées avec des cellules SP2/O irradiées (UV) ;
- groupe C : 4 souris ont été immunisées avec des cellules DH non irradiées ; et
- 25 - groupe D : 4 souris ont été immunisées avec des cellules DH irradiées (UV).

On a observé la mortalité sur une durée standard d'un mois après la première inoculation.

L'analyse de la réponse immunitaire humorale (ou taux d'immunisation) [étape (36)] a été effectuée à l'aide de la technique

E.L.I.S.A. Les tests ont été réalisés à partir d'échantillons de sérum dilués au millièème sur des plaques de 96 puits recouverts de cellules SP2/O, ceci afin d'évaluer qualitativement la présence d'anticorps dirigés contre les antigènes de ces cellules dans le sérum des animaux traités.

5 L'échelle adoptée pour la mesure a été la suivante :

0 aucune réponse

+ faible réponse

++ réponse moyenne

+++ réponse élevée

10 ++++ réponse très élevée.

Les résultats obtenus sont les suivants :

- groupe A : comme attendu, la mortalité due à des métastases (ascites) était de 100%, avec une survie moyenne de 10 à 15 jours.

15 - groupe B : il n'y pas eu de mortalité et la réponse immunitaire contre les cellules SP2/O était approximativement +/-, et pouvait aller jusqu'à + contre des cellules SP2/O fixes.

- groupe C : les résultats étaient similaires à ceux observés avec le groupe A, avec une mortalité élevée.

20 - groupe D : il n'y a pas eu de mortalité et la réponse immunitaire était située entre +++ et ++++.

Les groupes B et D ont été confrontés à l'inoculation de cellules SP2/O non irradiées (par conséquent capables d'induire une réponse tumorale avec ascite). Dans le groupe B, la mortalité était de 100%, tandis que, dans le groupe D, les souris restent en bonne santé après 4 mois.

25

30

REVENDICATIONS

1. Procédé automatisé de criblage *in vitro* et à grande échelle de cellules sécrétant au moins un anticorps monoclonal spécifique et affin
5 pour un composé d'intérêt, ledit procédé comprenant au moins les étapes suivantes :
- (10) la distribution de cellules productrices d'anticorps dans au moins un puits d'au moins une plaque de culture ;
- (12) la culture desdites cellules dans des conditions permettant leur
10 croissance, avec détection concomitante de la croissance cellulaire et de la qualité des cultures ;
- (14) le criblage itératif desdites cellules pour la sécrétion d'anticorps, avec clonage des cellules sécrétant au moins un anticorps interagissant avec ledit composé d'intérêt ; et
- 15 (16) la sélection d'au moins une cellule sécrétant un anticorps monoclonal spécifique et affin pour ledit composé d'intérêt.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit
20 composé d'intérêt est un antigène comprenant au moins un épitope.
3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que ledit
antigène est choisi parmi : des protéines, des acides nucléiques, des
particules virales, des peptides synthétiques, des composés chimiques,
des organes, des organelles, des cellules entières, des fragmentations
25 sub-cellulaires.
4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que ledit
antigène est une cellule tumorale.

5. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite distribution selon l'étape (10) est effectuée à raison d'au moins 3×10^5 cellules par puits.
- 5 6. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que chaque étape est réalisée en atmosphère stérile.
7. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite étape (10) est au moins précédée par les étapes préliminaires suivantes :
- 10 (1) l'immunisation d'au moins un animal, avec ledit composé d'intérêt ;
(2) facultativement, la mesure de la réponse immunitaire dudit animal ; et
(3) la récupération des cellules productrices d'anticorps.
8. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite étape (10) est au moins précédée par les étapes préliminaires suivantes :
- 15 (0) la mise en contact d'au moins une cellule dendritique et dudit composé d'intérêt, de sorte que ladite cellule dendritique présente au moins un épitope dudit composé d'intérêt ;
(1) l'immunisation d'au moins un animal, avec ladite cellule dendritique
20 présentant ledit épitope ;
(2) facultativement, la mesure de la réponse immunitaire dudit animal ; et
(3) la récupération des cellules productrices d'anticorps.
9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que, lorsque
25 ledit composé d'intérêt est une cellule tumorale, ladite étape (0) comprend au moins :
(01) la fusion de ladite cellule dendritique et de ladite cellule tumorale ; et
(02) la récupération d'au moins une cellule dendritique hybride.
- 30 10. Procédé selon la revendication 7 ou 8, caractérisé en ce que lesdites étapes préliminaires comprennent en outre :

- (4) la fusion desdites cellules productrices d'anticorps avec des cellules immortalisées ; et
- (5) la récupération des cellules productrices d'anticorps immortalisées.
- 5 11. Procédé selon la revendication 7 ou 8, caractérisé en ce que lesdites cellules productrices d'anticorps sont choisies parmi les cellules de souris, de rat, de lapin, d'homme.
12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que lesdites
10 cellules productrices d'anticorps sont des cellules de souris.
13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 12, caractérisé en ce que lesdites étapes préliminaires ne sont pas automatisées.
- 15 14. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite étape (14) de criblage itératif comprend au moins le module de criblage suivant, susceptible d'être itéré :
- le transfert du milieu de culture prélevé à partir d'au moins un puits
20 d'au moins une plaque de culture, dans au moins un puits d'au moins une plaque de criblage ;
 - le criblage des cellules pour au moins un critère de sélection donné ;
 - le repiquage sélectif des cellules satisfaisant ledit critère dans au moins un puits d'au moins une nouvelle plaque de culture ; et
 - 25 - la culture desdites cellules dans des conditions permettant leur croissance, avec détection concomitante de la croissance cellulaire et de la qualité des cultures.
15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que ladite
30 étape (14) comprend un module de précriblage, dans lequel ledit critère de sélection est la sécrétion d'anticorps :

- (140) le transfert du milieu de culture dans au moins un puits d'au moins une plaque de criblage ;
- (141) le précriblage des cellules pour la sécrétion d'anticorps ;
- (142) le repiquage sélectif des cellules sécrétant au moins un anticorps
- 5 sur au moins une plaque de culture ; et
- (143) la culture desdites cellules.
16. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que ladite étape (14) comprend un module de criblage primaire, dans lequel ledit
- 10 critère de sélection est la sécrétion d'anticorps interagissant avec ledit composé d'intérêt :
- (144) le transfert du milieu de culture dans au moins un puits d'au moins une plaque de criblage ;
- (145) le criblage primaire desdites cellules pour la sécrétion d'au moins un
- 15 anticorps interagissant avec ledit composé d'intérêt ;
- (146) le clonage des cellules sécrétant au moins un anticorps interagissant avec ledit composé d'intérêt ;
- (147) le repiquage des cellules clonées sur au moins une plaque de culture ; et
- 20 (148) la culture desdites cellules.
17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que ledit module de criblage primaire est mis en oeuvre après ledit module de précriblage selon la revendication 15.
- 25
18. Procédé selon la revendication 16 ou 17, caractérisé en ce que ladite étape (14) comprend en outre un module de criblage secondaire, dans lequel ledit critère de sélection est la sécrétion d'anticorps monoclonaux spécifiques dudit composé d'intérêt :
- 30 (149) le transfert du milieu de culture dans au moins un puits d'au moins une plaque de criblage ;

- (150) le criblage secondaire desdites cellules pour la sécrétion d'un anticorps monoclonal spécifique dudit composé d'intérêt ;
(151) le repiquage sélectif des cellules sécrétant un anticorps monoclonal spécifique dudit composé d'intérêt sur au moins une plaque de culture ; et
5 (152) la culture desdites cellules.

19. Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce que ladite étape (14) comprend en outre un module de criblage tertiaire, dans lequel ledit critère de sélection est la sécrétion d'anticorps monoclonaux spécifiques et affins pour ledit composé d'intérêt :

- 10 (153) le transfert du milieu de culture dans au moins un puits d'au moins une plaque de criblage ;
(154) le criblage tertiaire desdites cellules pour la sécrétion d'un anticorps monoclonal spécifique et affin pour ledit composé d'intérêt ; et
15 (155) facultativement, le repiquage sélectif des cellules sécrétant un anticorps monoclonal spécifique et affin pour ledit composé d'intérêt sur au moins une plaque de culture ; et
(156) facultativement, la culture desdites cellules.

20 20. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite étape (16) comprend :

- (16) la sélection d'au moins une cellule sécrétant un anticorps monoclonal de spécificité et/ou d'affinité pour ledit composé d'intérêt supérieures à celles des anticorps monoclonaux sécrétés par les autres cellules.

25

21. Procédé selon la revendication 1 ou 14, caractérisé en ce que ladite culture est effectuée sur une période comprise entre au moins 7 jours et au plus 21 jours, ladite période étant de préférence comprise entre 7 et 15 jours.

30

22. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'une banque cellulaire est constituée pour au moins un module de criblage.
23. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que ladite
5 étape (141) comprend au moins :
(1411) la détection de la sécrétion d'anticorps ; et
(1412) la sélection des cellules sécrétant au moins un anticorps.
24. Procédé selon la revendication 23, caractérisé en ce que ladite
10 étape (1411) comprend au moins :
(14111) le prélèvement d'au moins un échantillon de surnageant de culture ; et
(14112) la détection de la sécrétion d'anticorps dans ledit échantillon.
- 15 25. Procédé selon la revendication 23, caractérisé en ce que ladite étape (1411) comprend au moins la détection de la sécrétion d'anticorps directement dans les puits.
26. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que ladite
20 étape (145) comprend au moins :
(1451) le prélèvement d'au moins un échantillon de surnageant de culture ;
(1452) la détection de l'interaction des anticorps avec ledit composé d'intérêt dans ledit échantillon ; et
25 (1453) la sélection des cellules sécrétant au moins un anticorps interagissant avec ledit composé d'intérêt.
27. Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce que ladite
30 étape (150) comprend au moins :
(1501) le prélèvement d'au moins un échantillon de surnageant de culture ;

- (1502) la détection, dans ledit échantillon, d'une interaction spécifique entre un anticorps monoclonal et ledit composé d'intérêt ; et
(1503) la sélection des cellules sécrétant un anticorps monoclonal spécifique dudit composé d'intérêt.

5

28. Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que ladite étape (154) comprend au moins :

(1541) le prélèvement d'au moins un échantillon de surnageant de culture ; et

10 (1542) la mesure de l'affinité d'un anticorps monoclonal pour ledit composé d'intérêt.

29. Procédé selon la revendication 28, caractérisé en ce que l'étape (1542) comprend au moins :

15 (15421) la mesure de l'affinité d'un anticorps monoclonal pour ledit composé d'intérêt ; et

(15422) l'identification et/ou la localisation d'au moins un épitope dudit composé d'intérêt.

20 30. Procédé selon la revendication 29, caractérisé en ce que lesdites étapes (15421) et (15422) sont concomitantes.

31. Procédé selon la revendication 28, caractérisé en ce que l'étape (154) comprend en outre :

25 (1543) le classement des anticorps monoclonaux sur la base de leur spécificité et/ou de leur affinité pour ledit composé d'intérêt

1 / 3

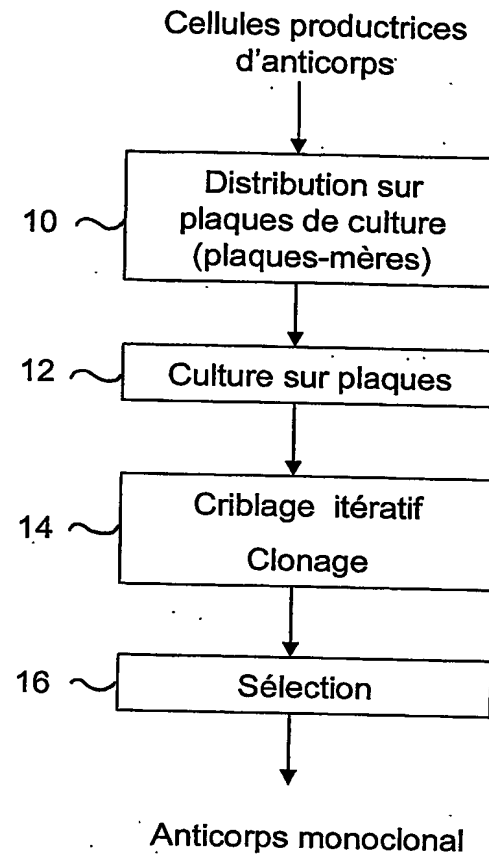


FIG. 1

2 / 3

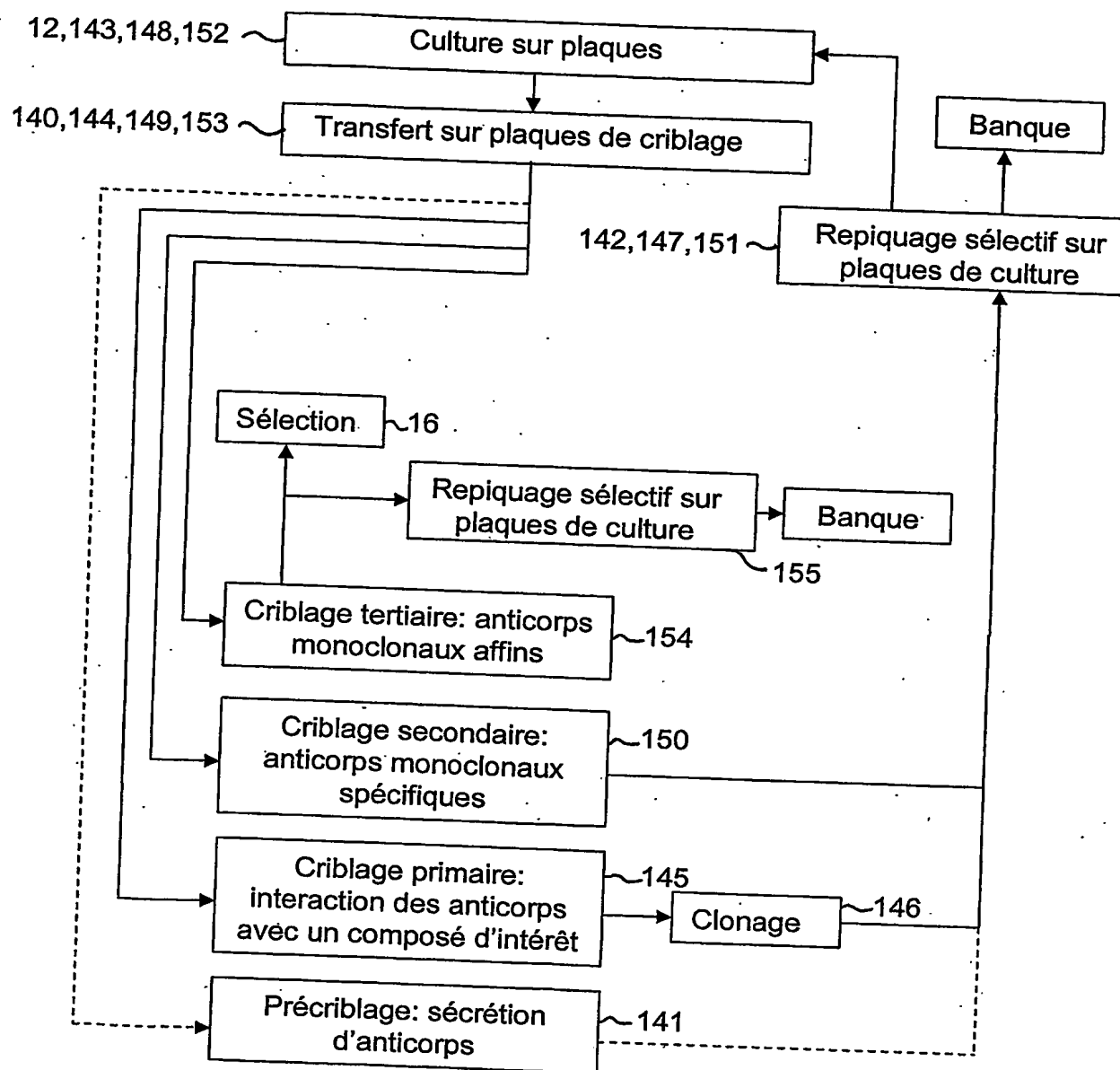


FIG. 2

3 / 3

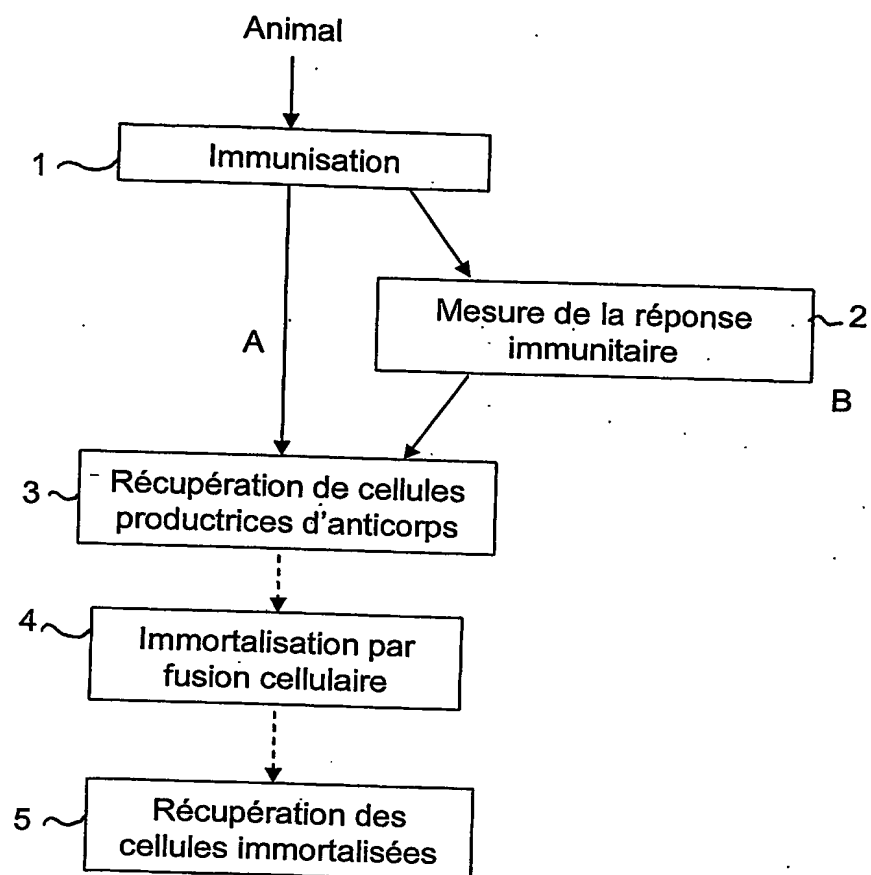


FIG. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2004/001482

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/68 G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 90/01066 A (BIO RES LAB INC) 8 February 1990 (1990-02-08)	1-7, 10-31
Y	page 20, line 20 - page 21, line 18 -----	8,9
X	EP 0 532 359 A (SHIMADZU CORP) 17 March 1993 (1993-03-17)	1-7, 10-31
Y	page 1, line 22 - line 37 -----	8,9
X	WO 99/02991 A (RES DEV FOUNDATION) 21 January 1999 (1999-01-21)	1-7, 10-31
Y	claim 8 -----	8,9
Y	US 2002/182194 A1 (TAO QUN ET AL) 5 December 2002 (2002-12-05)	8,9
	example 6 -----	
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 December 2004

Date of mailing of the international search report

28/12/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Jacques, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2004/001482

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 02/064057 A (BAYLOR COLLEGE MEDICINE ;WANG RONG-FU (US)) 22 August 2002 (2002-08-22) exemples	8,9
Y	----- STEINMAN RALPH M ET AL: "Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: Recent cell biological studies" HUMAN IMMUNOLOGY, vol. 60, no. 7, July 1999 (1999-07), pages 562-567, XP002273081 ISSN: 0198-8859 the whole document	8,9
A	----- LIU B ET AL: "Towards proteome-wide production of monoclonal antibody by phage display" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 315, no. 5, 1 February 2002 (2002-02-01), pages 1063-1073, XP004470827 ISSN: 0022-2836 the whole document -----	1-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

* Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2004/001482

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9001066	A	08-02-1990	EP 0429484 A1 JP 4500003 T WO 9001066 A1	05-06-1991 09-01-1992 08-02-1990
EP 0532359	A	17-03-1993	JP 5209881 A EP 0532359 A1	20-08-1993 17-03-1993
WO 9902991	A	21-01-1999	AU 739004 B2 AU 8389698 A CA 2295914 A1 CN 1263598 T EP 1000357 A1 JP 2001509397 T NZ 501963 A RU 2208641 C2 WO 9902991 A1 ZA 9806114 A	04-10-2001 08-02-1999 21-01-1999 16-08-2000 17-05-2000 24-07-2001 31-08-2001 20-07-2003 21-01-1999 10-01-2000
US 2002182194	A1	05-12-2002	CN 1377892 A	06-11-2002
WO 02064057	A	22-08-2002	WO 02064057 A2 US 2003077289 A1	22-08-2002 24-04-2003

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Document de Recherche Internationale No
PCT/FR2004/001482

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 G01N33/68 G01N33/50

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 90/01066 A (BIO RES LAB INC) 8 février 1990 (1990-02-08)	1-7, 10-31
Y	page 20, ligne 20 - page 21, ligne 18	8,9
X	EP 0 532 359 A (SHIMADZU CORP) 17 mars 1993 (1993-03-17)	1-7, 10-31
Y	page 1, ligne 22 - ligne 37	8,9
X	WO 99/02991 A (RES DEV FOUNDATION) 21 janvier 1999 (1999-01-21)	1-7, 10-31
Y	revendication 8	8,9
Y	US 2002/182194 A1 (TAO QUN ET AL) 5 décembre 2002 (2002-12-05) exemple 6	8,9
	----- -/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

3 décembre 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

28/12/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Jacques, P

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Document International No
PCT/FR2004/001482

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO 02/064057 A (BAYLOR COLLEGE MEDICINE ;WANG RONG-FU (US)) 22 août 2002 (2002-08-22) exemples	8,9
Y	----- STEINMAN RALPH M ET AL: "Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: Recent cell biological studies" HUMAN IMMUNOLOGY, vol. 60, no. 7, juillet 1999 (1999-07), pages 562-567, XP002273081 ISSN: 0198-8859 le document en entier	8,9
A	----- LIU B ET AL: "Towards proteome-wide production of monoclonal antibody by phage display" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 315, no. 5, 1 février 2002 (2002-02-01), pages 1063-1073, XP004470827 ISSN: 0022-2836 le document en entier	1-31

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Document de Internationale No
PCT/FR2004/001482

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9001066	A	08-02-1990	EP 0429484 A1 JP 4500003 T WO 9001066 A1	05-06-1991 09-01-1992 08-02-1990
EP 0532359	A	17-03-1993	JP 5209881 A EP 0532359 A1	20-08-1993 17-03-1993
WO 9902991	A	21-01-1999	AU 739004 B2 AU 8389698 A CA 2295914 A1 CN 1263598 T EP 1000357 A1 JP 2001509397 T NZ 501963 A RU 2208641 C2 WO 9902991 A1 ZA 9806114 A	04-10-2001 08-02-1999 21-01-1999 16-08-2000 17-05-2000 24-07-2001 31-08-2001 20-07-2003 21-01-1999 10-01-2000
US 2002182194	A1	05-12-2002	CN 1377892 A	06-11-2002
WO 02064057	A	22-08-2002	WO 02064057 A2 US 2003077289 A1	22-08-2002 24-04-2003